

ÉTUDE DES CONSTITUANTS DES FEUILLES DE PIPER METHYSTICUM FORST.

Par P. JÖSSANG et D. MOLHO

Piper methysticum est une plante qui a joué un grand rôle en Océanie. Ainsi que le remarque VAN VEEN, « la racine de Kawa a été tenue en haute estime par les Polynésiens depuis des temps reculés par suite de son usage pour préparer un extrait qui, bu, est censé réduire la fatigue et produire une complète absence d'anxiété » (1).

Le kawa (ou kava) — qui désigne aussi bien la racine de *Piper methysticum* que le breuvage et la cérémonie qui accompagne l'absorption de celui-ci — fait du reste l'objet de légendes qui attestent son usage très ancien. Il semble avoir suivi les courants de migration ; actuellement, son emploi est encore répandu à Ponapé, en Micronésie, aux îles Fidji, aux Nouvelles-Hébrides, chez les Marins du sud de la Nouvelle-Guinée et en Polynésie centrale — Samoa, Wallis et Futuna, peut-être Tonga (2).

Il existe plusieurs variétés de *P. methysticum*, qui diffèrent notamment par la pigmentation de la tige ; l'activité (narcotique et euphorisante) dépend de la variété (la « rouge » étant plus efficace que la « verte ») (3).

De plus, la plante fraîche fournit un breuvage laiteux verdâtre, considérablement plus actif que le liquide jaune laiteux obtenu à partir de la plante sèche. La racine mâchée se comporte comme un véritable somnifère (après dix ou quinze minutes, le sujet perd l'usage de ses membres et s'endort d'un sommeil profond, durant 8 à 10 heures (4), alors que la boisson préparée en malaxant légèrement la poudre séchée dans de l'eau froide est sans effet apparent (2).

En réalité, ces contradictions apparentes sont simplement dues au fait que, pour être active, la drogue doit être finement émulsionnée, au moyen de salive, de lécithine ou d'huile et d'eau (3) afin de disperser les principes actifs.

Le kawa donne lieu à un véritable rite dont le « kawa royal » est l'aspect le plus spectaculaire (5). La racine broyée au mortier est humectée et malaxée, les morceaux de racines éliminés en passant dans le liquide un tamis de fibres. La couleur indique si le kawa est « bon ou bien trop fort ».

Il était naturel que les propriétés de *P. methysticum* suscitent l'intérêt des chimistes en vue d'en isoler le ou les principes actifs, et de très nombreux travaux ont été consacrés à l'étude du rhizome depuis plus d'un siècle. Le travail fondamental est dû à BORSCHÉ et al. (6) qui, dans une suite de treize mémoires, décrivent l'isolement d'une première série de composés, les kawalactones (yangonine, kawaïne, méthysticine, dihydrokawaïne et dihydrométhysticine).

La déhydrokawaïne est isolée par KLOHS et al. (7), sa structure élucidée par GOTTLIEB et MORS (8) ; récemment, HÄNSEL et KLAPROTH (9) obtiennent à partir de la racine une faible proportion de méthoxy-11 yangonine.

Deux produits qui ne sont pas des lactones, mais des chalcones, sont de même

isolés par HÄNSEL et al. (10) : ce sont les flavokawines A et B ; MOLHO et JÖSSANG (11) isolent de la racine deux substances, la cinnamylidène-acétone (ou cinnamalacétone) et la méthylène dioxycinnamylidène-acétone, qui appartiennent à une troisième série de produits, les cétones éthyléniques et aromatiques. (Les formules de ces différents composés sont indiquées fig. 1).

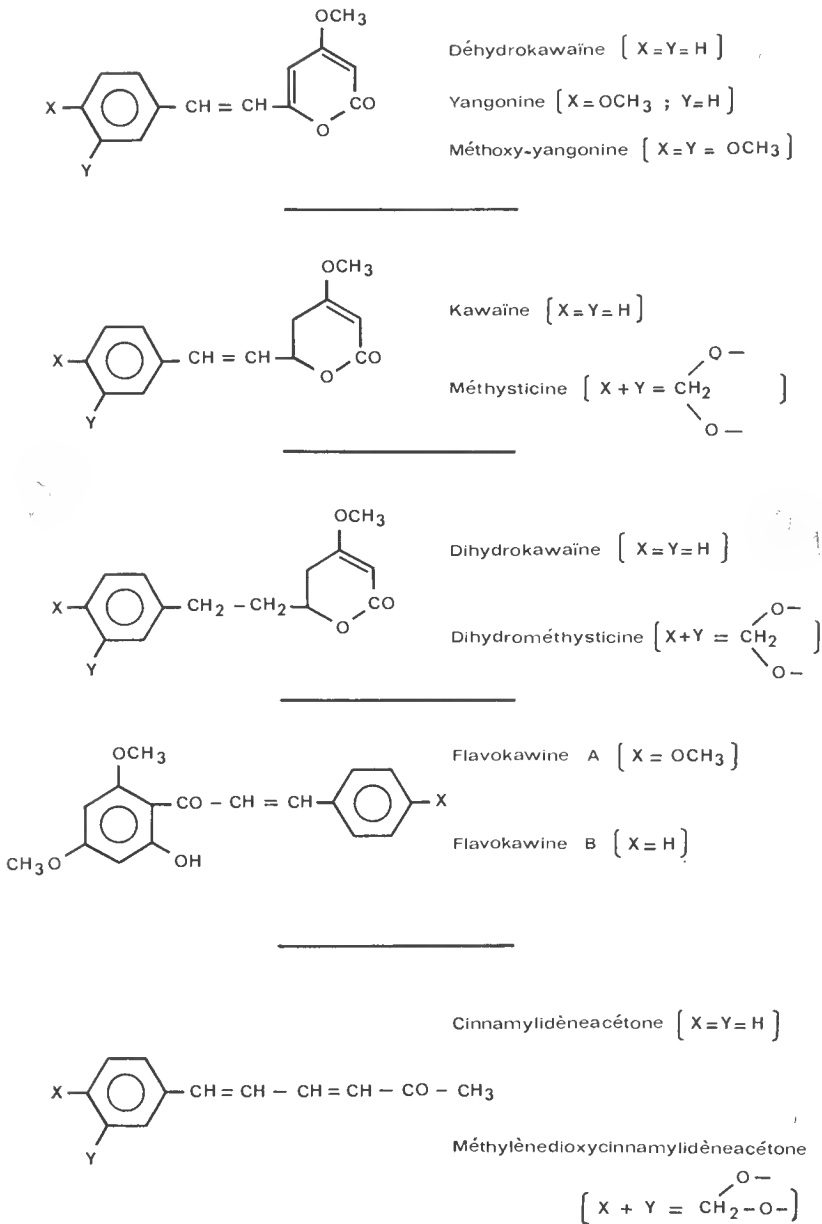


FIG. 1.

BORSCHÉ, dans sa dernière publication, parvient à la conclusion que « ces... observations ne nous ont pas beaucoup aidé pour répondre à la question originale puisqu'elles n'ont pas abouti à la découverte d'une substance chimiquement bien définie qui puisse être considérée comme le principal vecteur de l'action du kawa ».

C'est VAN VEEN (12) qui, le premier, démontra que la dihydrokawaïne était la substance responsable de l'activité de la drogue sur le système nerveux central ; il crut du reste qu'elle était la seule à avoir cet effet.

Dans une étude plus récente, KLOHS et al. (7) concluent que les kawalactones s'opposent aux convulsions provoquées par la strychnine et potentialisent l'action des barbituriques. Il est intéressant de noter que, d'après les résultats de ces auteurs, la dihydrokawaïne et la dihydrométhysticine sont de très loin les produits les plus actifs.

MEYER et KRETZSCHMAR (13) remarquent que le renforcement de l'effet narcotique s'étend au protoxyde d'azote et à l'éther ; que les kawalactones produisent en outre des phénomènes de paralysie, d'abaissement du métabolisme et, à doses élevées, de l'ataxie. Ils font observer que ces substances sont des relaxants musculaires du type de la méphénésine et sont, à cet égard, supérieurs aux produits de synthèse (propanedioles, benzazoles, benzo-1,4 diazépines) ; les kawalactones se révèlent plus efficaces que la méphénésine — antidote classique — pour combattre l'intoxication par la strychnine.

Notons enfin que l'extrait de rhizome est utilisé dans le traitement des irritations dues à la blennorrhagie.

Toutes ces recherches concernaient le rhizome ; or, dès 1860, SEEMANN (14), dans le compte rendu d'une expédition aux îles Fidji, signale que des feuilles de *Piper methysticum* sont suspendues dans les temples indigènes ; VAN VEEN (3) indique en outre que, si les racines et les tiges sont utilisées de façon générale, il est fait usage dans certaines tribus « d'une sorte de thé, thé de kawa vert et noir ». C'est pourquoi, il nous a paru intéressant d'examiner les feuilles de *P. methysticum* qui, à notre connaissance, n'avaient jamais été étudiées.

Nous avons mis en œuvre à cet effet les techniques que nous avons déjà utilisées pour le rhizome.

La présence des pigments chlorophylliens complique d'une façon générale l'analyse des feuilles par rapport à celle des parties souterraines des plantes. On peut remédier à cet inconvénient en chromatographiant l'extrait brut, d'abord sur silice — les pigments verts donnent dans ces conditions des bandes nettes, sans traînées, dont les Rf sont supérieurs à ceux des lactones — puis sur alumine, qui autorise la séparation des diverses lactones entre elles.

En ce qui concerne les produits qui migrent comme les pigments chlorophylliens, on peut éliminer ces derniers par filtration sur charbon végétal. La chromatographie analytique sur couches minces met d'emblée en évidence un contraste frappant entre l'extrême complexité de la composition du rhizome et la simplicité de la composition des feuilles.

En révélant à l'acide sulfurique ou à l'iode, on note dans ce dernier cas deux produits principaux (I) et (II). Ces composés sont isolés par chromatographie sur couches non liées.

(I) et (II) se présentent en cristaux blancs, F : 118° C et F : 57° C respectivement.

Ils comportent tous deux une bande lactone dans l'infrarouge à 5,87 μ ; en outre (II) comporte deux bandes à 14,3 et 13,3 μ qui suggèrent un noyau oro-

matique monosubstitué, alors que (I) comporte de nombreuses et fortes bandes dans la région 10 — 13 μ indiquant une substitution aromatique plus complexe.

Les spectres de R.M.N. indiquent :

— dans le cas de (I), 3 protons aromatiques à 6,7 ppm et deux protons d'un groupe méthylène dioxy à 5,9 ppm, un singulet correspondant à un proton à 5,15 ppm, un méthoxyle à 3,7 ppm ; un proton donnant un ensemble complexe de pics centrés sur 4,4 ppm et 3 groupements CH_2 (entre 2 et 3 ppm).

— celui de (II) ne diffère du précédent que par la présence de 5 protons aromatiques à 7,25 ppm (et l'absence d'un groupement méthylène dioxy), ce qui confirme la présence d'un noyau aromatique nonosubstitué.

Les données précédentes indiquent clairement que l'on se trouve en présence de dihydrométhysticine (I) et de dihydrokawaïne (II) respectivement.

Les spectres U.V. étant caractéristiques des diverses kawalactones (7), nous avons vérifié que le spectre de (I) était identique à celui de la dihydrométhysticine ($\lambda_{\text{max}} = 230$ et $283 \text{ m}\mu$), celui de (II) identique au spectre de la dihydrokawaïne ($\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ m}\mu$).

Les spectres U.V. permettent en outre de contrôler la séparation chromatographique des deux lactones, la dihydrokawaïne pure ne devant pas présenter de maximum à $283 \text{ m}\mu$.

Les pouvoirs rotatoires de (I) et (II) ont été mesurés, les valeurs obtenues montrent qu'il s'agit des mêmes isomères optiques que ceux décrits par BOJSCHNE et al. (15).

La dihydrokawaïne étant beaucoup plus soluble dans les solvants que la dihydrométhysticine, nous avons profité de cette circonstance pour mettre au point un procédé permettant d'isoler de la dihydrométhysticine par cristallisation, sans avoir recours à la chromatographie. Il suffit en effet d'extraire les feuilles séchées et broyées à l'hexane ou à l'éther de pétrole, et, par refroidissement, la dihydrométhysticine, peu soluble, cristallise. On peut éventuellement recristalliser ensuite du méthanol.

L'isolement de la dihydrométhysticine à partir de rhizomes étant très laborieuse, les feuilles de *Piper methysticum* apparaissent donc comme une source particulièrement commode pour l'obtention de cette substance. Par ailleurs, la récolte des rhizomes implique la destruction de la plante, il n'en est pas de même des feuilles.

En plus de la dihydrokawaïne et de la dihydrométhysticine, nous avons constaté la présence sur les chromatoplaques de faibles quantités de flavokawines (A) et (B) ; nous avons isolé de ces composés une quantité suffisante pour obtenir un spectre infrarouge, ce qui a permis de confirmer leur identité.

Des traces de yonganine et de déhydrokawaïne n'ont pu être caractérisées que sur chromatoplaques, qui ont, en outre, montré la présence d'un autre constituant mineur (S) migrant comme le β -sitostérol et se révélant comme ce dernier par l'acide sulfurique concentré.

Isolé par chromatographie préparative sur couches épaisses, (S) se présente en aiguilles blanches, F : 139°C .

La comparaison avec un échantillon de référence de β -sitostérol permet de conclure à l'identité (point de fusion mixte, spectre infrarouge). Ce phytostérol n'avait pas été rencontré dans le rhizome.

L'absence certaine dans les feuilles de kawaïne et de méthysticine — si faci-

lement détectables par l'acide sulfurique concentré et qui abondent dans la racine — est très remarquable.

On peut chercher à expliquer ce fait par une hypothèse biogénétique. Deux schémas peuvent être envisagés en ce qui concerne la biosynthèse des kawalactones.

— *Une première voie* partirait de l'acide cinnamique et conduirait, par addition de deux restes acétiques et méthylation, aux styrylpyrones, telle la déhydrokawaine :

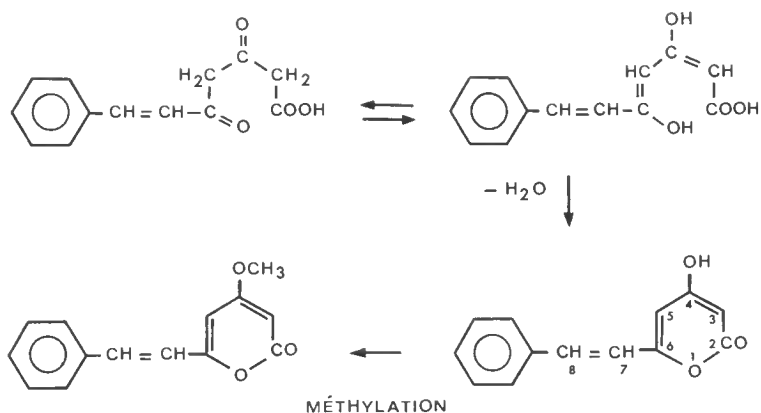


FIG. 2.

Les produits ainsi obtenus possèdent deux doubles liaisons conjuguées en 5-6 et 7-8 respectivement.

— *Une deuxième voie* ferait intervenir un système réducteur, le précurseur n'étant plus l'acide cinnamique, mais l'alcool correspondant.

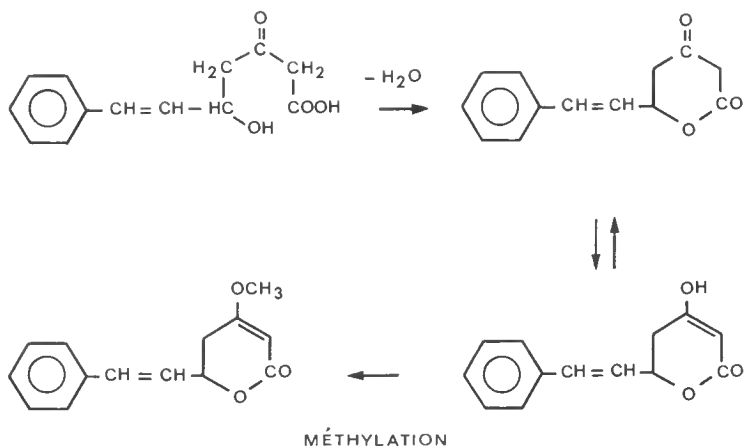


FIG. 3.

On aboutirait ainsi directement aux styryldihydropyrones, telle la kawaine, qui ne possèdent plus de double liaison en 5-6.

De telles structures, contrairement aux précédentes, seraient dans les feuilles immédiatement réduites en 7-8, ce qui expliquerait l'absence de kawaine et de méthysticine dans ces organes.

Ces réductions n'affecteraient pas la configuration absolue du carbone asymétrique en 6 ; la kawaine, la méthysticine, la dihydrokawaine et la dihydrométhysticine présenteraient dès lors la même configuration absolue, or c'est précisément ce que viennent d'établir SNATZKE et HÄNSEL (16) en utilisant le dichroïsme circulaire.

On peut remarquer qu'il n'y a rien de surprenant à voir les feuilles aptes à effectuer les réductions des dihydropyrones en tétrahydropyrones. En effet, la photoréduction de nombreuses substances organiques a pu être réalisée en présence d'homogénéisats de feuilles par VOROBEVA et KRASNOVSKII (17), cependant que BROWN et al. (18) ont pu mettre en évidence, par microscopie électronique, que la réduction du nitrate d'argent dans les feuilles se produit dans les chloroplastes, mais aussi sur les faces interne et externe de la membrane cellulaire. Ils concluent que la chlorophylle n'est pas impliquée directement, mais que l'acide ascorbique pourrait l'être. MITSUI et OHTA (19) démontrent que la substance réductrice endogène est l'acide ascorbique ; MAPSON (20) étudie l'influence de divers facteurs sur l'oxydoréduction de l'acide ascorbique dans les feuilles.

L'étude expérimentale de la biogénèse des kawalactones au moyen de molécules marquées reste à faire, mais elle devra tenir compte de l'inégale répartition de ces composés dans les diverses parties de la plante et mettre en évidence d'éventuelles migrations.

Au point de vue pharmacodynamique, les feuilles devraient être examinées quant à leurs propriétés en raison de leur haute teneur en dihydrokawaine et dihydrométhysticine, ces composés étant de beaucoup les plus efficaces par leur activité euphorisante et anticonvulsivante parmi les divers constituants.

Nous remercions vivement le Département de l'Agriculture des îles Fidji pour la collecte et l'envoi de feuilles de *Piper methysticum*.

Partie expérimentale

Les spectres infrarouges ont été effectués dans des pastilles de bromure de potassium sur Infracord Perkin Elmer ; les spectres ultra-violet dans l'éthanol sur spectrophotomètre Beckmann D B ; les spectres de R.M.N. sur un appareil Varian A 60, dans le deutériochloroforme ; les pouvoirs rotatoires sur un polarimètre automatique Perkin Elmer 141.

Isolement de la dihydrométhysticine et de la dihydrokawaine

80 g de feuilles séchées et finement broyées de *Piper methysticum* sont extraites avec 500 cm³ d'éthanol au Soxhlet pendant 20 h ; on évapore sous vide au bain-marie, reprend par le chloroforme (50 cm³), filtre, évapore sous vide. On obtient 7,6 g d'un extrait huileux.

Pour éliminer les pigments chlorophylliens, on opère comme suit : 600 mg

d'extrait sont chromatographiés sur une couche épaisse de gel de silice selon la technique décrite en détail par ailleurs (11).

On développe successivement avec :

- toluène/acétate d'éthyle (100/15) (v v) deux fois, puis
- toluène/acétate d'éthyle (100/30) deux fois.

La zone 3-6 cm (à partir de l'origine), exempte de pigments chlorophylliens, est éluee, puis chromatographiée de nouveau sur alumine neutre d'activité 1. On développe successivement avec :

- toluène/acétate d'éthyle (100/6) une fois,
- toluène/acétate d'éthyle (100/16) deux fois,
- hexane/éther éthylique/acétate d'éthyle (50/45/24) trois fois.

La zone 7,5-10 cm fournit 14,8 mg de dihydrométhysticine, F : 116-8°.

La zone 12-15 cm fournit 18 mg de dihydrokawaïne, F : 54-7°.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés dans le méthanol, mais en plus dans l'éthanol absolu dans le cas de la dihydrokawaïne, ainsi que l'avait fait BORSCHÉ.

Dans le méthanol $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ (dihydrométhysticine) = + 18,6°

$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ (dihydrokawaïne) = + 30,5°

Dans l'éthanol absolu $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ (dihydrokawaïne) = + 29,6°

Isolement de la dihydrométhysticine par cristallisation

410 g de feuilles séchées et finement broyées sont extraites en deux fois, chaque fois 48 h, au Soxhlet, par 750 cm³ d'hexane ; par refroidissement, la dihydrométhysticine cristallise ; on reprend dans 4 cm³ de méthanol froid, essore, lave trois fois avec quelques gouttes de méthanol ; on isole 1,46 g de dihydrométhysticine, F : 112-117°. Recristallisé du méthanol ; F : 114-118°.

Isolement du β -sitostérol et des flavokawines A et B

20 g de feuilles séchées et broyées sont extraites 24 h au Soxhlet à l'hexane ; on obtient 0,7 g d'extrait.

400 mg d'extrait sont chromatographiés sur une plaque de silice ; on développe 3 fois avec du toluène/formiate d'éthyle (100/10).

La zone 4,5-7 cm est éluee (en filtrant sur 2 mm de charbon végétal) ; le produit élué cristallise du méthanol en aiguilles blanches. F : 138-139°. Rf = 0,38 sur Kieselgel G activé 30 mn à 103°.

Solvant : tétrachlorure de carbone/hexane/formiate d'éthyle (50/50/20).

Révéléateur : acide sulfurique concentré.

La zone 7-12 cm est éluee ; l'éluat évaporé à sec fournit un spectre I.R. identique à celui de la flavokawine A et le même spectre U.V. (λ_{max} : 362 m μ). La zone 12-13,8 donne un spectre I.R. identique à celui de la flavokawine B et le même spectre U.V. (λ_{max} : 340 m μ).

Des traces de yanonine et de dihydrokawaïne sont détectées sur chromatoplaque par leur fluorescence (Rf : 0,56 et 0,7, respectivement).

Ces pyrones sont chromatographiées sur alumine G Merck activée à 115°, 30 mn. On développe avec toluène/formiate d'éthyle (100/6) deux fois, puis deux fois avec hexane/éther éthylique/formiate d'éthyle (60/40/20).

Laboratoire de Chimie
du Muséum d'Histoire naturelle

BIBLIOGRAPHIE

- (1) A. G. VAN VEEN. — *Geneesk. Tijdschr.*, 1938, **78**, p. 1941.
- (2) J. BARREAU. — *J. Agric. tropic. Bot. appl.*, 1957, **4**, n^{os} 5-6, p. 270.
- (3) A. G. VAN VEEN. — *Koninkl. nederl. Akad. Wetenschap. Proc.*, 1938, **41**, n^o 7, p. 857.
- (4) W. D. RAYMOND. — *Colonial Plant Animal Pd G. B.*, 1951, **2**, n^o 1, 46.
- (5) M. GAILLOT. — *Ét. mélanésiennes*, déc. 1959-déc. 1962, 4^e sér., **14-17**, pp. 95-105.
- (6) W. BORSCHÉ et M. LEWINSOHN. — *Chem. Ber.*, 1933, **66**, p. 1792.
- (7) M. W. KLOHS, F. KELLER, R. E. WILLIAMS, M. I. TOEKES et G. E. CRONHEIM. — *J. med. pharm. Chem.*, 1959, **1**, p. 95.
- (8) O. R. GOTTLIEB et W. B. MORS. — *J. org. Chem.*, 1959, **24**, p. 1614.
- (9) R. HÄNSEL et L. KLAPROTH. — *Arch. Pharm.*, 1966, **299**, p. 503.
- (10) R. HÄNSEL, P. BÄHR et J. ELICH. — *Arch. Pharm.*, 1961, **294**, p. 739.
- (11) P. JÖSSANG et D. MOLHO. — *J. Chromatogr.*, 1967, **31**, p. 375.
- (12) A. G. VAN VEEN. — *Rec. Trav. chim. Pays-Bas*, 1939, **58**, p. 521.
- (13) H. J. MEYER et R. KRETZSCHMAR. — *Klin. Wschr.*, 1966, **44**, p. 902.
- (14) B. C. SEEMANN. — *Flora Viliensis*. Reeve Ed., London, 1865-1873, pp. 260-261.
- (15) W. BORSCHÉ et W. PEITZSCH. — *Chem. Ber.*, 1929, **62**, p. 365 et *ibid.*, 1930, **63**, p. 2416.
- (16) G. SNATZKE et R. HÄNSEL. — *Tetrah. Lett.*, 1968, **15**, p. 1797.
- (17) L. M. VOROBEVA et A. A. KRASNOVSKII. — *Biokhimiya*, 1958, **23**, p. 760.
- (18) W. V. BROWN, H. MOLLENHAUER et C. JOHNSON. — *Amer. J. Bot.*, 1962, **49**, p. 57.
- (19) A. MITSUI et T. OHTA. — *Plant Cell. Physiol., Tokyo*, 1961, **2**, p. 31.
- (20) L. W. MAPSON. — *Biochem. J.*, 1962, **85**, p. 360.

Le Gérant : D. GRMEK-GUINOT